云 南 植 物 研 究 2009，31 (4)：344～352
Acta Botanica Yunnanica DOI：10.3724 SP.J.1143.2009.09090

ABA 信号转运调节的基因表达与源库动力学分析

魏开发[1]，**贾文锁**[2]
(1 漳州师范学院生物科学与技术系，福建 漳州 363000；2 中国农业大学农学与生物技术学院，北京 100094)

摘要：通过对拟南芥 NCED3、AAO3 及 SDR1 蛋白亚细胞定位分析及根系和叶片 ABA 池的动态库变化研究，结果表明气孔运动的有效 ABA 信号来自于保卫细胞之外，SDR 与 ABA 前体加工和运输有关。胁迫处理后根系合成酶基因转录水平显著高于叶片，但叶片 ABA 水平是根系的 10 倍以上，离体叶片和附体叶片 ABA 含量测定表明，叶片 ABA 池的形成主要决定于根源 ABA 的输入。氟啶酮药剂阻断和遮荫实验说明根系 ABA 池受叶源类胡萝素前体供应影响。叶片 ABA 水平受根源 ABA 和叶源类胡萝素前体库双向转运调节，维管束组织系统可能协同和整合了这一复杂调节机制。该结论为逆境 ABA 信号转递机制研究和操纵内源 ABA 含量增强植物抗逆性的应用提供相关资料。

关键词：ABA 合成酶基因；基因表达；源库动力学；SE-CC 复合体；转运调节
中图分类号：Q 342.3 **文献标识码**：A **文章编号**：0253 - 2700 (2009) 04 - 344 - 09

Analysis of Gene Expression and Source-sink Dynamics in Transportation Regulation of ABA Signal Accumulation

WEI Kai-Fa[1 **]，JIA Wen-Suo[2]
(1 *Department of Biological Sciences and Biotechnology*，*Zhangzhou Normal University*，Zhangzhou 363000，China；
2 *College of Agronomy and Biotechnology*，*China Agricultural University*，Beijing 100094，China)

Abstract：Subcellular localization of AtNCED3，AtAAO3 and AtSDR1 proteins，and dynamic changes of ABA levels in root and leaf were investigated in the present study . Results showed that the guard cells were not the main site of ABA biosynthesis，and SDR might play an important role in ABA precursor processing and transportation . The transcription level of ABA synthase gene in roots was significantly higher than that in leaves under dehydration condition，while the ABA concentration in leaf tissues were 10 times higher than root . Detection of ABA concentration in both detached leaves and attached leaves suggested that ABA accumulation in leaves was mainly derived from root-sourced ABA，it was confirmed that ABA synthesis in roots was affected by the supply of precursor carotenoids with the fluridone treatment and shading experiments . These data revealed that ABA levels in leaves were regulated by root-sourced ABA transportation and leaf-sourced carotenoids supply . Our present results showed that vascular system might be involved in the coordination and integration of this complex regulatory mechanism for ABA signal accumulation . The conclusion provided relevant information for exploring molecular mechanism of stress signal transduction，manipulating endogenous ABA levels，and enhancing plants resistance against environmental stresses .

Key words：ABA synthase gene；Gene expression；Source-sink dynamics；SE-CC；Transportation regulation

脱落酸（ABA）广泛参与植物生长发育、繁殖及胁迫响应等生理过程，如果实成熟与种子萌发、

基金项目：福建省自然科学基金（B0810040）、福建省教育厅 A 类科技项目（JA08154）资助
通讯作者：Author for correspondence；E-mail：kaifa-wei@163.com
收稿日期：2009 - 05 - 06，2009 - 05 - 20 接受发表
作者简介：魏开发（1966 - ）男，博士，主要从事植物分子遗传学与基因工程研究。

蛋白及脂类物质贮藏、长距离胁迫信号传递及抗逆性提高等（Mambelli and Setter，1998；Jia等，2002b；Ren等，2007a）。ABA生物合成路径中的酶主要包括：玉米黄质环氧化酶（ZEP），9-顺式-环氧类胡萝卜素双氧合酶（NCED），短链脱氢还原酶（SDR），ABA醛氧化酶（AAO）和钼辅硫化酶（MCSU）（Marin等，1996；Schwartz等，2003）。代谢酶主要是ABA-8′羟化酶（CYP707As）及糖基转移酶（Krochko等，1998；Saito等，2004；Umezawa等，2006）。植物各生理过程中特定ABA含量受合成、转运及代谢等精细调控，转运调节在ABA信号动态累积中的贡献研究与合成酶基因及代谢酶基因转录调节研究一样重要（Ren等，2007b）。ABA合成和代谢酶基因的发育和环境调节研究较多（Pierce and Raschke，1981；Ian等，2000；Wang等，2002；Ren等，2007c），而转运调节少有研究。转运调节是一个长距离信号加工和呈递的过程，除了受源库距离、信号分子存量、转运通道性质等影响外，还与胁迫信号感知与处理、系统信号整合与协同等有关，其研究将直接应用于从分子水平定向干预内源ABA信号强度的抗逆基因工程等。转运调节研究首先要解决的是生物合成酶定位问题，这关系到胁迫激素ABA合成场所及转运，由于*SDR*1及*AAO*3基因编码产物是催化ABA合成的最后步骤（Seo等，2000a），其蛋白定位可能就是ABA合成部位，这些部位与ABA信号长距离传递有关，本文从*NCED*3、*AAO*3及*SDR*1基因表达蛋白亚细胞定位开始，结合根系ABA池及叶片ABA池的动态库变化，分析叶片ABA信号积累的动力学特征，期望为逆境ABA信号转递机制研究和操纵内源ABA含量增强植物抗逆性应用提供帮助。

1 材料和方法

1.1 材料

拟南芥种子直接播种于装有花卉营养土、蛭石和细沙（2∶1∶1）的混合土壤的盆中（15 cm×10 cm）。4℃处理3 d后，移至光照300 μmol $m^{-2}s^{-1}$，温度23℃ 20℃，相对湿度80%，光照时间12 h的生长室中。在拟南芥苗抽苔1 cm时，剪去苔的尖端使次生花生长，花蕾显白时可开始第一次转化，间隔一周转化一次，共转化三次。

1.2 方法

1.2.1 *GUS*融合基因表达载体构建 对*NCED*3、*AAO*3及*SDR*1进行生物信息学分析后，从拟南芥基因组克隆启动子（包括5′-UTR）及编码区部分序列（包括内含子）插入pCAMBIA-1391表达载体，构建GUS融合蛋白表达载体：*NCED*3 *promoter*-*NCED*3∷*GUS*，*AAO*3 *promoter*-*AAO*3∷*GUS*，*SDR*1 *promoter*-*SDR*1∷*GUS*，引物分别是：*NCED*3：5′-CTGCAGAGCAATCGTGATGGAGGGAAG-3′，5′-ACTAGTGGCGGGAGAGTTTGATGATTG-3′；*AAO*3：5′-CGACTGCAGCAAGAGAGTATCTAACGATTTCA-3′，5′-CAGAGATCTCAAGACCTTCAGATGTAGTAATG-3′；*SDR*1：5′-CTGCAGCAGAACATCATTGTTCAAGCC-3′，5′-ACTAGTTGGATTTCCAAAAACATTGCT-3′。PCR程序为：*NCED*3：94℃预变性5 min，94℃变性30 s，67℃退火30 s，72℃延伸2 min 50 s，循环次数24，72℃延伸7 min。*AAO*3：94℃预变性5 min，94℃变性30 s，58℃退火50 s，72℃延伸3 min 20 s，循环次数24，72℃延伸10 min。*SDR*1：94℃预变性4 min，94℃变性30 s，57℃退火50 s，72℃延伸2 min 50 s，循环次数24，72℃延伸7 min。

1.2.2 稳定转化及抗性植株筛选 Floral dip转化与抗性植株筛选参见Clough等（1998）的方法。

1.2.3 GUS染色及PCR检测 用90%丙酮冰上固定30 min，用缓冲液洗涤两次，缓冲液比例：760 μl 50 mmol L^{-1} $NaHPO_4$（pH7.0）：10 μl 50 mmol L^{-1} K_3［Fe（CN)$_6$］：10 μl 50 mmol L^{-1} K_4［Fe（CN)$_6$］，染色液为：0.5 mg X-gluc：760 μl 50 mmol L^{-1}磷酸钠缓冲液（pH7.0）：10 μl 50 mmol L^{-1} K_3［Fe（CN)$_6$］：10 μl 50 mmol L^{-1} K_4［Fe（CN)$_6$］：10 μl 0.5 mol L^{-1} EDTA：1 μl Triton X-100：200 μl甲醇。PCR管每管加60 μl，可放入5株左右的小苗，苗龄最好在5～9 d，低龄小苗不需加负压，半小时即可显色，一般染色5～6 h即可，不可染色太久。苗龄较大或成株需加负压2 min，用70%酒精脱色数小时，显微镜下观察GUS染色部位及着色深浅。

1.2.4 胁迫处理 短期干旱胁迫处理：用锋利刀片沿叶柄基部切下叶片，在室温、自然气流条件下失水至原鲜重的70%，后密封在100%湿度条件下以阻止叶片的进一步脱水，叶片脱水胁迫并温育不同时间后取样，进行基因表达分析或测定ABA含量。长期干旱胁迫处理：植株培养3周后停止浇水，当发现叶片萎蔫后，将整体植物密封在100%湿度的有机玻璃生长室中以阻止叶片的进一步脱水。植株在拟南芥生长室中继续生长，不同时间后取样，进行基因表达分析或ABA含量测定。

1.2.5 氟啶酮对离体根系及叶的处理 离体拟南芥根系及叶用50 μmol L^{-1}的氟啶酮（fluridone）真空渗透处理，温育30 min，随后进行干旱处理，处理方法同1.2.4，再进行ABA含量测定。

1.2.6 基因表达半定量RT-PCR分析 RNA提取采用

QIAGEN 公司 RNeasy Plant Minikit，cDNA 合成采用 Promega 公司的 M-MLV Reverse Transcriptase (M1701)。基本程序如下：取 1 μg RNA，加 1 μg Oligo (dT)$_{15}$，70℃热激 5 min，之后加入 5 μl M-MLV buffer，1.25 μl dNTP Mix，1 μl M-MLV，0.6 μl RNase inhibitor，采用 25 μl 反应体系，37℃反应 1 h。反应完毕后将 cDNA 产物稀释 4 倍，取 2 μl 为底物，用扩增 *Actin*2 基因 cDNA 片段的引物进行 PCR 反应，循环数应控制在使所有底物均以对数形式扩增的范围之内。根据扩增产物的量将各样品的 cDNA 进一步稀释成相同的浓度，使得取 2 μl 样品，以 *Actin*2 引物扩增 35 个循环时，仍处在对数扩增的范围内。以 *Actin*2 基因的扩增量为内标，扩增目标基因的 cDNA 片段，目标基因扩增 35 个循环，对不同样品中基因片段的扩增量进行比较。PCR 相关引物为：*ZEP*：5′-ATTTGACGGTTGGTGCGACA-3′，5′-CTCTCATTCTTCCTCGTCGATTT-3′；*NCED*3：5′-CAACGGAGCTAACCCACTTCA-3′，5′-ACCCTATCACGACGACTTCATCT-3′；*SDR*1：5′-AGGGATAGGTGAGAGCATTGTTC-3′，5′-CGCTACATCATCAACCGTCAGT-3′；*AAO*3：5′-GCTTCCTGGCATTTGGTTCTTAT-3′，5′-TCTTTCGCTCAGCTTCTTCC-3′；*ABA*3：5′-ACCAGTGACCTTATAGCGGATGC-3′，5′-CGTTGGGCCTGATTTATGTGAA-3′；*Actin*2：5′-CTTCCCTCAGCACATTCCAG-3′，5′-CCCAGCTTTTTAAGCCTTTG-3′。PCR 条件为：94℃ 5 min，94℃ 45 s，58℃ 45 s，72℃ 1 min，35 个循环，72℃ 7 min。

1.2.7 Real Time RT-PCR　RNA 提取采用 QIAGEN 公司 RNeasy Plant Minikit，cDNA 合成采用 Promega 公司的 M-MLV Reverse Transcriptase (M1701)。Real Time PCR 采用 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒 (TaKaRa DRR041S)。PCR 仪型号 MJR PTC200。所用引物，*ZEP*：5′-ATTTGACGGTTGGTGCGACA-3′，5′-CTCTCATTCTTCCTCGTCGATTT-3′；*NCED*3：5′-CAACGGAGCTAACCCACTTCA-3′，5′-ACCCTATCACGACGACTTCATCT-3′；*AAO*3：5′-GCTTCCTGGCATTTGGTTCTTAT-3′，5′-TCTTTCGCTCAGCTTCTTCC-3′。PCR 程序：95℃ 10 s，95℃ 5 s，58℃ 20 s，40 个循环。Real Time PCR 结果分析采用 $2^{-\triangle CT}$ 方法，以 *Actin*2 做为参照基因 (Pfaffl, 2001)。

1.2.8 ABA 含量测定　ABA 测定采用放射免疫分析方法。测定的基本程序参照 Quarrie 等 (1988) 的方法。实验的基本程序如下：叶片取样后液氮速冻，冰冻干燥后磨成干粉。取 50 mg 干粉加 0.5 ml 蒸馏水，在 4℃下震荡 24 h，13 000 r min^{-1} 离心 15 min 后取上清测 ABA 含量。50 μl ABA 提取液，加 250 μl 磷酸盐缓冲液 (pH6.0)，100 μl ABA 抗体工作液及 100 μl ^{3}H-ABA，放射强度为 2 000 dpm，混合后在 4℃下反应 45 min，结合态的 ^{3}H-ABA 用 50%饱和硫酸氨沉淀后，用 100 μl 蒸馏水溶解。加 1.5 μl 闪烁液，充分混合后，用液体闪烁谱仪测定放射强度。根据 ABA 标准回归曲线计算 ABA 浓度。

2 结果与分析

2.1 *NCED*3、*AAO*3 及 *SDR*1 基因表达和蛋白定位分析

基因表达调控决定于启动子的特性，蛋白质定位及功能与信号肽有关，基于对 *NCED*3、*AAO*3 及 *SDR*1 启动子基序和蛋白序列信号肽分析结合启动子功能研究 (魏开发，2009a)，构建如图 1 所示的表达载体。

*NCED*3 *promoter-NCED*3::*GUS* 对拟南芥的稳定表达显示，关键酶基因 *NCED*3 主要在叶片叶绿体 (图 2：e)、维管束及根系表达 (图 2：h)，其中根尖表达水平最高 (图 2：g)，显示 *NCED*3 在

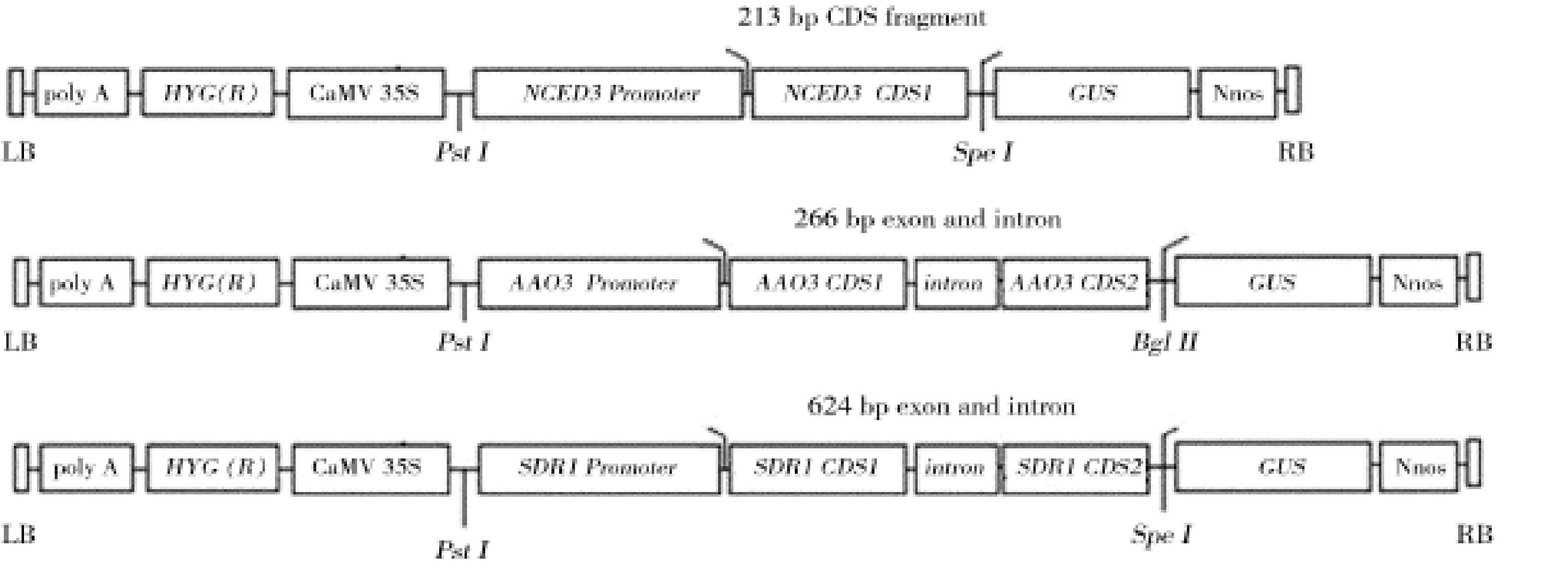


图 1　*NCED*3 *promoter-NCED*3::*GUS*、*AAO*3 *promoter-AAO*3::*GUS* 和 *SDR*1 *promoter-SDR*1::*GUS* 融合基因表达载体构建

Fig. 1　Construction of *GUS* fusion gene expression vector of *NCED*3 *promoter-NCED*3::*GUS*, *AAO*3 *promoter-AAO*3::*GUS*, and *SDR*1 *promoter-SDR*1::*GUS*

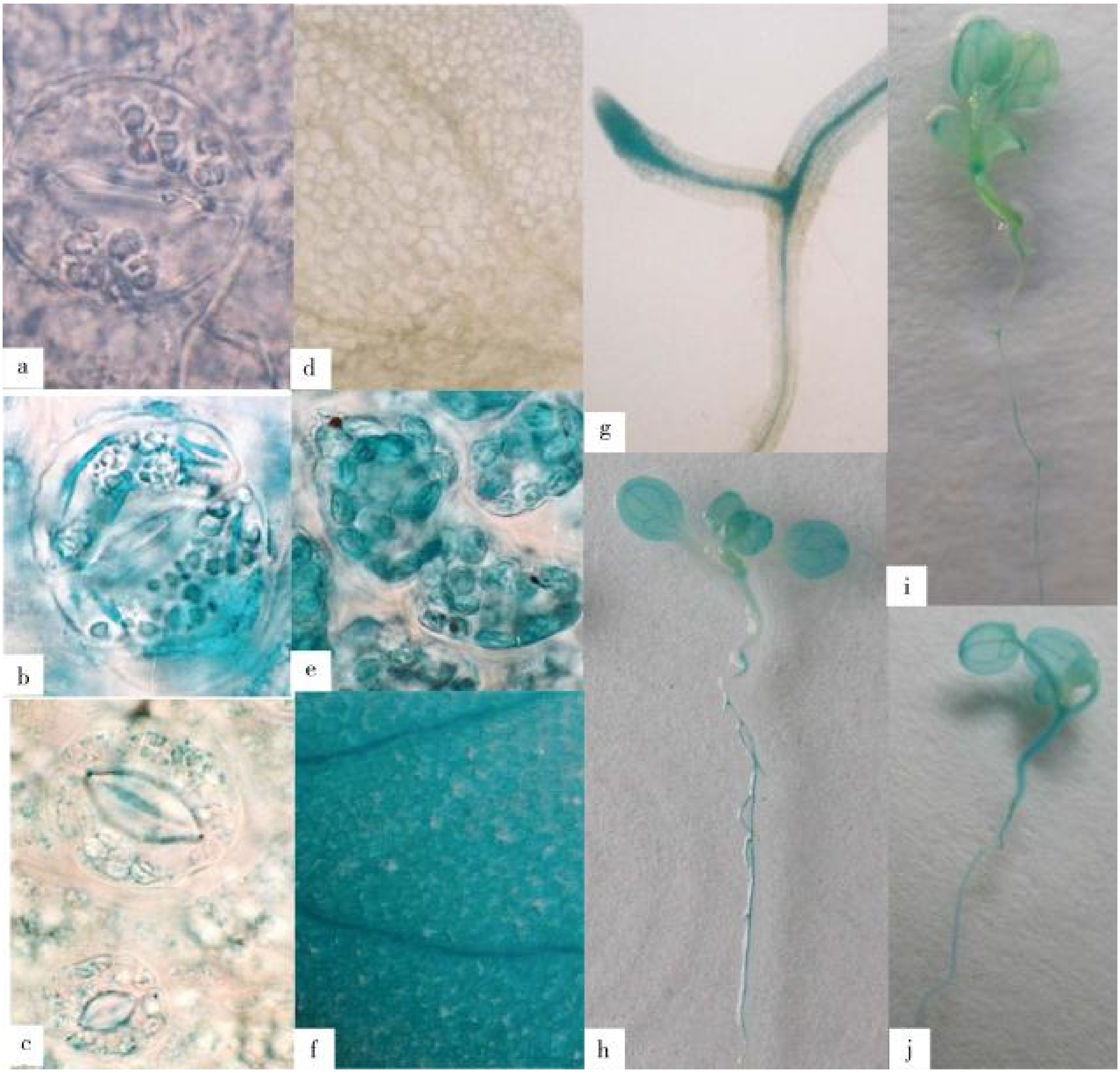


图 2　NCED3、AAO3 和 SDR1 蛋白亚细胞定位

a．非转基因叶片保卫细胞；b．*NCED*3 在保卫细胞中表达；c．*AAO*3 在保卫细胞中表达；d．非转基因叶片组织；e．*NCED*3::*GUS* 在叶绿体中表达；f．*AAO*3::*GUS* 在细胞质中表达；g．*NCED*3::*GUS* 在根尖表达；h．*NCED*3::*GUS* 在维管组织中表达；i．*SDR*1::*GUS* 在维管组织中表达；j．*AAO*3::*GUS* 在维管组织中表达

Fig．2　Subcellular localization analysis of NCED3, AAO3 and SDR1 proteins

a．guard cells of non-transgenic leaf; b．*NCED*3::*GUS* expressed in guard cells; c．*AAO*3::*GUS* expressed in guard cells; d．non-transgenic leaf tissue; e．*NCED*3::*GUS* expressed in the chloroplasts; f．*AAO*3::*GUS* expressed in the cytoplasm; g．*NCED*3::*GUS* expressed in the root tip; h．*NCED*3::*GUS* expressed in the vascular tissue; i．*SDR*1::*GUS* expressed in the vascular tissue; j．*AAO*3::*GUS* expressed in the vascular tissue

胁迫信号感知、根系胁迫信号起源及根源 ABA 积累方面的重要作用。*NCED*3 *promoter-NCED*3::*GUS* 在保卫细胞的表达水平（图 2：b）较周围叶肉细胞及根尖细胞低，说明保卫细胞能合成部分 ABA，但 ABA 水平远低于周围细胞及根尖组织。

*AAO*3 *promoter-AAO*3::*GUS* 在维管束（图 2：j）、叶肉细胞（图 2：f）及保卫细胞（图 2：c）中表达，表达部位与 Koiwai 等（2004）的研究基本吻合。*AAO*3 在叶肉细胞质中的高表达，显示其在叶源 ABA 形成过程中的贡献（Seo 等，2000b）。*AAO*3::*GUS* 在保卫细胞中的低水平表达，与周围叶肉细胞中 *AAO*3::*GUS* 融合基因表

达水平形成鲜明对照，保卫细胞中 *AAO*3 的低水平表达也得到 Christmann 等（2005）的研究结果支持。结合前述 *NCED*3 在保卫细胞中的表达水平，得到与 Weiler 等（1982）相似的结论，即保卫细胞能合成部分 ABA。但相对于周围叶肉细胞 ABA 水平，保卫细胞自身合成的 ABA 不足以调节气孔的完全关闭，作者观察到叶片或是内源或是外源 ABA 水平的大幅变化才导致气孔彻底关闭进一步佐证了这一观点。Melhorn 等（2008）的 *AtNCED*3::*GFP* 和 *AAO*3::*GFP* 表达盒在剥离表皮气孔中表达致气孔开度减少到 66% 和 86.3%的实验证据也表明，调节气孔运动的有效 ABA 信号来源于保卫细胞之外。

NCED3::GUS 及 AAO3::GUS 在维管束系统的高水平合成，说明处于长距离物质转运通道上的 NCED3 及 AAO3 在叶片 ABA 积累过程中的贡献，这一结论也受到 AAO3 在韧皮部伴胞细胞和木质部薄壁细胞精确定位（Christmann 等，2005）研究的支持。作者通过维管束组织特异性启动子驱动 *NCED*3 及 *AAO*3 的 RNA 干扰显示，胁迫条件下转基因叶片 ABA 水平与非转基因叶片相比没有太大的变化（另文发表），说明维管束组织中 NCED3 和 AAO3 的酶活对保卫细胞外 ABA 流形成的重要性，即维管组织在 ABA 合成、ABA 前体加工中起重要作用。

*SDR*1::*GUS* 只在维管系统中表达（图 2: i），其表达水平不受脱水影响，显示 *SDR*1 独特的基因表达调控方式。*SDR*1 是一个大的基因家族，一直被认为功能相对单一，作用就是将黄质醛转化为 ABA 醛（Cheng 等，2002）。胁迫条件下 *SDR*1 在维管束组织中表达量不高，但不能说明其酶活不高，SDR1 对脱水胁迫条件下 ABA 生物合成不构成瓶颈效应，显示其对 ABA 流的推动作用，ABA 合成酶基因 *SDR*1 不在细胞质中表达，说明维管组织在叶片 ABA 积累中的重要性，即 SDR1 不仅与 ABA 前体加工有关，还与 ABA 前体转运有联系。

2.2 胁迫条件下 ABA 池的形成

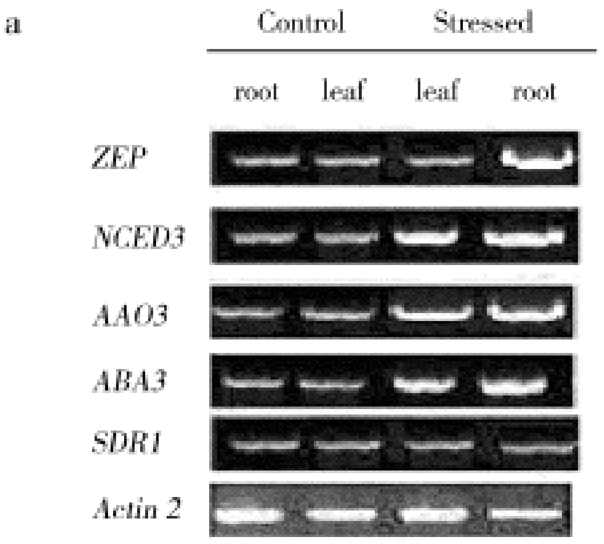
脱水处理后，叶片中 *NCED*3、*AAO*3 及 *ABA*3 均上调表达，*SDR*1 不受脱水胁迫影响，*ZEP* 基因转录水平在叶片中也没有明显变化，但在根中 *ZEP* 受脱水诱导明显增强表达，且 *NCED*3 及 *AAO*3 在根中的表达水平也均高于脱水诱导的叶片表达水平（图 3: a），说明胁迫条件下，合成酶基因在根和叶片中存在不同的表达模式。

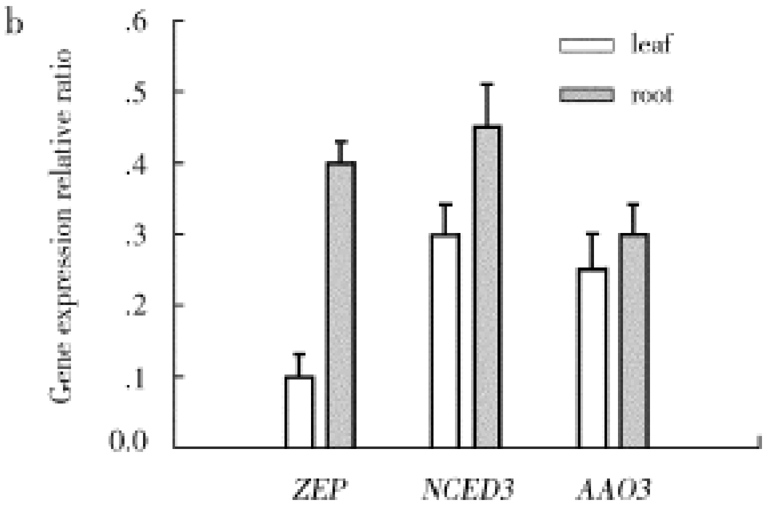
研究中还观察到根部 *NCED*3 基因转录较叶片早，表明根尖对水份胁迫信号快速感知之后首先触发的是根系 *NCED*3 的转录，开启根源 ABA 的合成，这和 Jia 等（2002a）胁迫条件下根部 ABA 合成的触发较叶片敏感结论相同。胁迫信号感知后合成的根源 ABA 是否作为早期信号启动叶片 ABA 的生物合成呢？作者的根系 ^{3}H-ABA 饲喂实验，显示绝大部分外源 ABA 转运到叶片；*NCED*3 启动子区域 ABA 基序（ABRE）的存在表明 *NCED*3 可被终产物 ABA 反馈调节；作者在 *NCED*3 雌二醇诱导的基因表达体系中发现，*NCED*3 基因高表达提升的内源 ABA 水平正反馈调节了合成酶基因的表达（魏开发等，2009b）。由此作者认为根源 ABA 流首先作为长距离信号转运到叶片，启动了叶片 ABA 生物合成进程，正反馈调节叶片 ABA 信号积累，同时通过负反馈调节限制特定生理过程的 ABA 水平上限及效应时长，实现 ABA 池的精细调节。

Real time RT-PCR 研究结果表明，脱水胁迫下，*ZEP*、*NCED*3 及 *AAO*3 等合成酶基因在根系的转录水平明显高于叶片（图 3: b）。一般情况下，根系因合成酶基因的高表达，应在根系形成 ABA 高池，但干旱处理后，根系 ABA 水平只提升到 850 pmol g^{-1} FW 左右。相反，拟南芥未脱水叶片 ABA 含量为 250 pmol g^{-1} FW，脱水处理的叶片 ABA 累积可增加 10 倍以上，远高于胁迫条件下根系 ABA 水平（图 3: c）。逆境条件下，叶片形成 ABA 高池，根系形成 ABA 低池。叶片 ABA 高池的形成，是由于叶片 ABA 合成受多级调控，特别是根系因合成酶基因协同加速，形成持续的 ABA 输出能力的作用结果。这种很大的势差只有靠转运调节才能维持，本结论得到 Bertrand 等（1992）实验证据的支持。

2.3 转运调节与 ABA 池的动态控制

离体叶片脱水处理 4 h 后 ABA 含量达到最大值（图 4: a），随着处理时间的延长，ABA 水平迅速下降。而对整株植株长期干旱处理，随着干旱进程的推进，ABA 含量迅速上升，6 天后 ABA 含量达到最高水平，在随后的时间中，该水平始





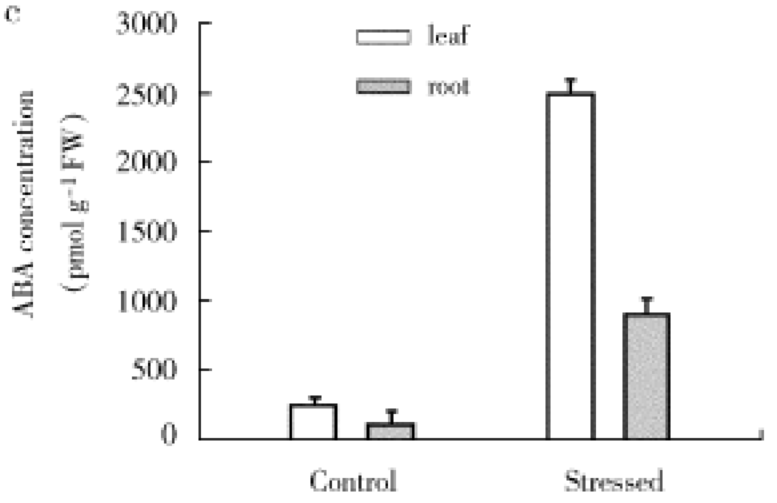


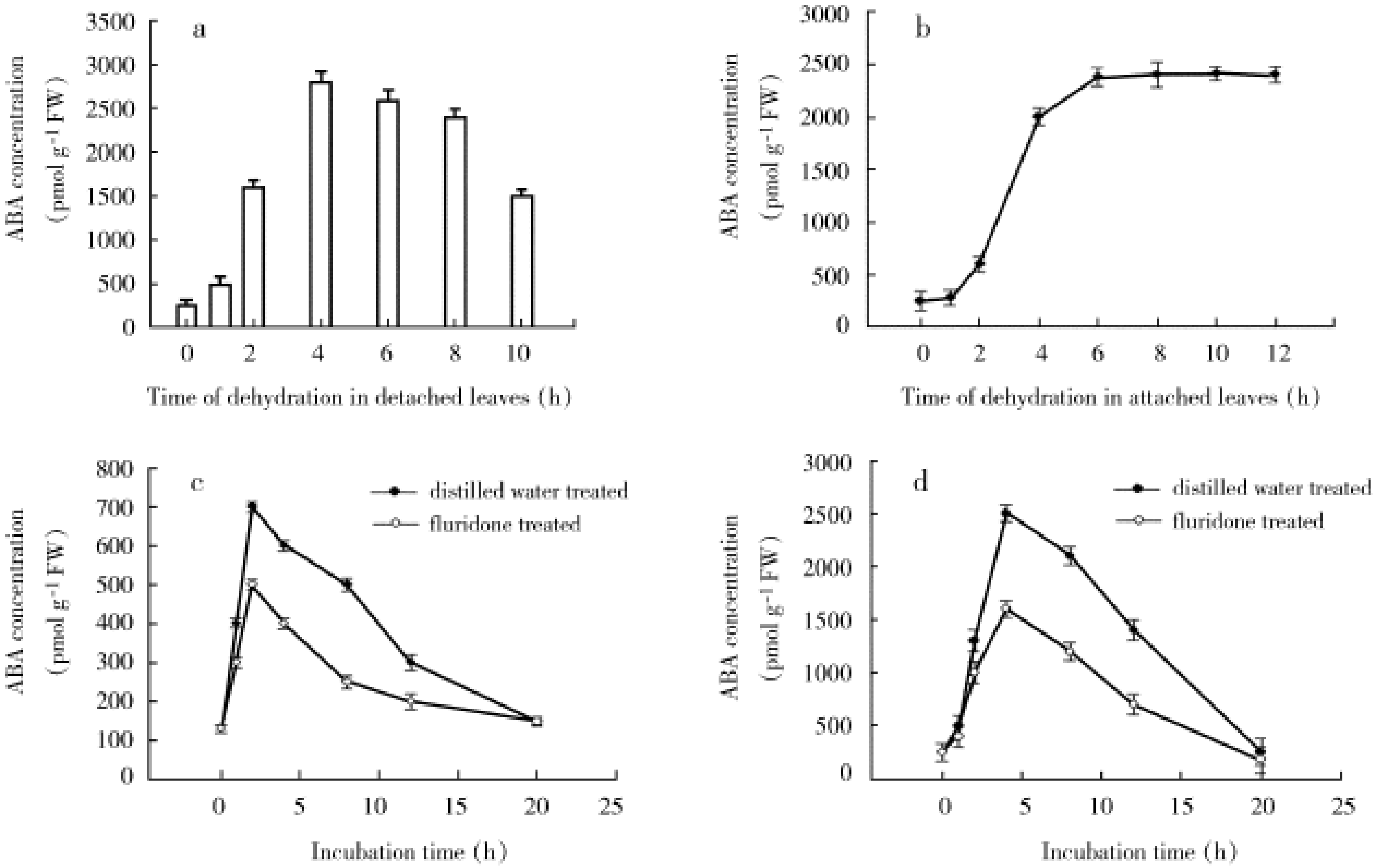
图 3　胁迫条件下合成酶基因表达与根、叶 ABA 含量测定
a. 短时间水分胁迫下 ABA 合成酶基因半定量 RT-PCR 分析；
b. 脱水胁迫下 *ZPE*、*NCED3*、*AAO3* 在叶片和根中
基因相对表达量的 Real Time RT-PCR 分析；
c. 脱水处理叶片和根系 ABA 含量比较

Fig. 3　Gene expression analysis of synthase gene and detection of ABA concentration in leaves and roots under water stress
a. synthase gene expressions analysis with semi-quantitative RT-PCR under water deficiency stress; b. analyses of gene expression relative ratio of *ZEP*, *NCED3* and *AAO3* via real time RT-PCR; c. comparative analysis of ABA content in dehydrated leaves and roots

终维持在相对稳定的状态（图 4：b）。比较离体叶片和附体叶片 ABA 积累动态，不难看出根系存在对叶片 ABA 累积的重要性。由于有根系 ABA 池的持续供应，叶片 ABA 池依靠包括转运调节在内的多种方式实现 ABA 水平的精细调节，保持特定生理过程中 ABA 水平的动态平衡。根源 ABA 包括其它维管束组织合成的 ABA 随着蒸腾流运输到保卫细胞，被质膜上的受体 ABAR 等识别而调控气孔的关闭（Razem 等，2004；Shen 等，2006）。ABA 转运调节在胁迫条件下叶片 ABA 高池形成中起了重要作用，并通过影响 ABA 合成和代谢速率，实现特定生理过程 ABA 动态库水平控制，在 ABA 自我催化合成、形成胁迫诱导的叶片 ABA 高池、提高植物逆境快速应变能力方面发挥作用。

胁迫条件下根系 *NCED*3 基因的高水平表达、合成酶基因的协同加速，需要类胡萝卜素前体的持续供应。叶片 ABA 池能保持动态稳定，是因有庞大的“类胡萝卜素前体库”支持（Li and Walton，1987；Parry 等，1990），叶片类胡萝卜素前体即 9-*cis*-violaxanthin 和 9′-*cis*-neoxanthin 的含量要比 ABA 高出 200 倍左右，可是根部类胡萝卜素前体库水平较低，显然胁迫诱导的根部 ABA 池形成会受到限制。对叶黄素合成药剂阻断实验发现，与离体叶片相比离体根中 ABA 积累对叶黄素合成抑制剂氟啶酮处理更为敏感，在大约 1 h 时，氟啶酮处理就明显减少了 ABA 的积累，这说明离体根中的前体库不能维持 ABA 较长时间的积累（图 4：c），而几天内附着根中的 ABA 积累却能维持在一个稳定的水平。氟啶酮处理后离体叶片 ABA 池快速下降，显示胁迫条件下，叶源 ABA 对 ABA 池的贡献，同时，由于根源 ABA 的输入被切断，加上叶黄素生物合成受到抑制，叶片 ABA 水平下降速率更快（图 4：d）。避光处理 48 h 或 72 h 也会减少根中 ABA 的积累（图 4：e），这与 Setter 等（2001）结论相似。由此，要维持胁迫诱导的根系 ABA 池水平，ABA 前体物包括类胡萝卜素向根部的转运就必不可少。

根系 ABA 池受逆境上调并接受叶源类胡萝素前体输出形成持续的根系 ABA 动态库，结合前述根系和叶片合成酶基因的不同表达模式，并



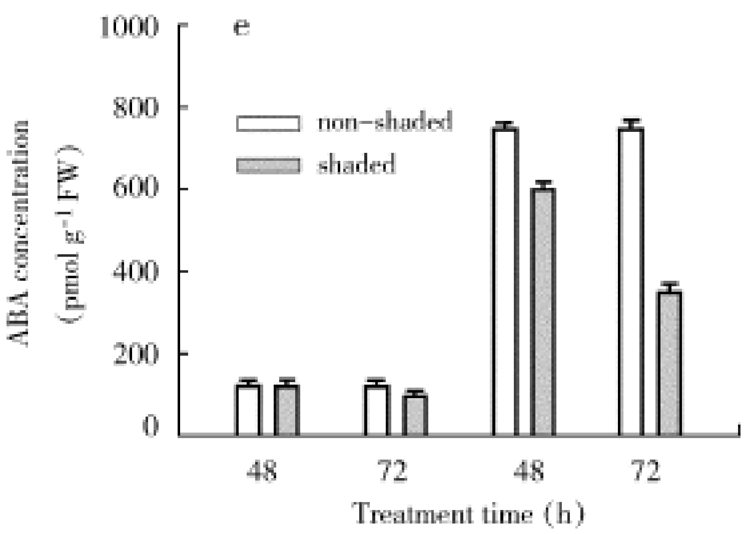


图 4 转运调节在 ABA 信号积累中的作用

a. 离体叶片 ABA 池积累动态；b. 附体叶片 ABA 积累动力学曲线；c. 氟啶酮处理对离体根系干旱诱导 ABA 积累的影响；d. 氟啶酮处理对离体叶干旱诱导 ABA 积累的影响；e. 避光对干旱附着根中 ABA 积累的影响

Fig. 4 Functions of transportation regulation in ABA signal dynamic accumulation

a. ABA pool dynamic changes in detached leaves; b. ABA pool dynamic changes in attached leaves under dehydration stress; c. effect of fluridone treatment on water deficit-induced ABA accumulation in detached roots; d. effect of fluridone treatment on water deficit-induced ABA accumulation in detached leaves; e. effect of shading on water deficit-induced ABA accumulation in attached roots

未在根系形成 ABA 高池，相反，由于前体库的持续支持，使得叶片 ABA 池有了维持动态平衡的基础。由此，转运调节不仅涉及根系 ABA 池向叶片的运输，还包括叶源类胡萝素前体库向根系的转移。目前，单向转运的机制和双向转运的协同都不清楚。

3 讨论

特定生理过程的 ABA 信号水平受合成、代谢及转运等调节。如同在 ABA 合成和代谢酶基因调控体系中寻找信号组份以建立逆境信号转导网络一样 (Xing 等，2003；Xing and Jia，2007；Choi，2007)，转运调节的机制探讨同等重要。

胁迫处理前后叶片及根系 ABA 水平的变化不能从合成酶基因单基因转录水平得到解释，因为转录水平的差异不能反映 ABA 池水平的改变，其中既存在合成酶基因的协同加速，也存在转运调节和代谢速率变化的影响，或者说，ABA 水平的动态维持依赖 ABA 合成速率、代谢速率及转运速率之间的有机统筹，特别是在 ABA 信号的形成和解除过程中，突显这一机制的重要性。

源库端筛管伴胞复合体 (SE-CC) 对溶质和大分子物质在伴胞细胞和叶肉细胞转运中起重要作用，这种作用包括监控进出韧皮部物质的性质、控制进入筛管物质的装载量。*NCED*3、*AAO*3 和 *SDR*1 基因表达分析，特别是 *AAO*3 在韧

皮部伴胞细胞和木质部薄壁细胞的精确定位，显示 ABA 合成和装载在伴胞细胞和木质部薄壁细胞中可能受到调控，推测维管组织在渗透胁迫监测、ABA 合成、ABA 转运等方面起“调度中心”的作用。同时，木质部汁液及 pH 作为一个辅助信号有助于强化 ABA 信号的效应，参与 ABA 对气孔导性的调控（Borel 等，2001；Jia and Davies，2007），**根源 ABA 信号在木质部运输过程中质子的游离及土壤氮素的补充会造成木质部汁液的碱化**（Leydecker 等，1995；Jia 等，1996），**而影响 ABA 由木质部及叶肉细胞向保卫细胞的转运。合成酶基因蛋白定位研究提示，质体中 ABA 前体存在跨膜进入细胞质的短途转运，其调控机制不明。伴随根源 ABA 向叶片 ABA 高池转运的同时，根源 ABA 前体也可能加入了向叶片长距离转运的过程中，在维管组织完成了 ABA 合成，维管组织中高酶活的 SDR1 等 ABA 合成酶充当了“动力泵”的作用。**

*NCED*3、*AAO*3 **和** *SDR*1 **基因表达研究、胁迫条件下合成酶基因表达模式及叶片和根系 ABA 积累动力学特征研究显示，转运调节与根系 ABA 合成速率、维管组织 ABA 转运和装载、叶片与根系 ABA 池大小探测甚至胁迫信号感知后的系统信号统筹等密切相关。基因表达与 ABA 源库动力学两方面的实验证据相互印证，强烈揭示转运调节在 ABA 信号控制中的重要作用，其中处于支配地位的可能是维管组织系统，或者说维管组织系统协调和整合了合成酶基因和代谢酶基因的表达及 ABA 的转运调节，实现了特定生理过程中的 ABA 动态库的精细调控。只有提高 ABA 源或库的大小，并提升 ABA 信号的转运效率才能有效操纵内源 ABA 水平，提高植物抗逆性**（Audran 等，1998；Qin 等，2002；Yang 等，2008；Xiong 等，2003；Saito 等，2006；Yang 等，2006，2008）。**而维管组织系统作为 ABA 信号水平控制的监测和调度中心，其信号系统的关联、信号的整合等急需研究。**

〔参　考　文　献〕

Audran C，Borel C，Frey A *et al.*，1998．Expression studies of the zeaxanthin epoxidase gene in *Nicotiana plumbaginifolia*［J］．*Plant Physiology*，118（3）：1021—1028

Bertrand S，Benhamou N，Nadeau P *et al.*，1992．Immunogold localization of free abscisic acid in tomato root cells［J］．*Canadian Journal of Botany*，70（5）：1001—1011

Borel C，Audran C，Frey A *et al.*，2001．*N. plumbaginifolia* zeaxanthin epoxidase transgenic lines have unaltered baseline ABA accumulations in roots and xylem sap，but contrasting sensitivities of ABA accumulation to water deficit［J］．*Journal of Experimental Botany*，52：427—434

Cheng WH，Endo A，Zhou L *et al.*，2002．A unique short-chain dehydrogenase reductase in *Arabidopsis* glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions［J］．*The Plant Cell*，14：2723—2743

Christmann A，Hoffmann T，Teplova I *et al.*，2005．Generation of active pools of abscisic acid revealed by in vivo imaging of water-stressed *Arabidopsis*［J］．*Plant Physiology*，137（1）：209—219

Choi D，2007．Ethylene-induced stem growth of deepwater rice is correlated with expression of gibberellin- and abscisic acid-biosynthetic genes［J］．*Journal of Plant Biology*，50（5）：595—599

Clough SJ，Bent AF，1998．Floral dip：a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transfomation of *Araidopsis thaliana*［J］．*The Plant Journal*，16（6）：735—743

Ian B T，Alan B，Andrew JT，2000．Control of abscisic acid synthesis［J］．*Journal of Experimental Botany*，51：1563—1574

Jia WS，Davies WJ，2007．Modification of leaf apoplastic pH in relation to stomatal sensitivity to root-sourced abscisic acid signals［J］．*Plant Physiology*，143（1）：68—77

Jia WS，Wang YQ，Zhang SQ *et al.*，2002a．Salt-stress-induced ABA accumulation is more sensitively triggered in roots than in shoots［J］．*Journal of Experimental Botany*，53：2201—2206

Jia WS，Xing Y，Lu CM *et al.*，2002b．Signal transduction from water stress perception to ABA accumulation［J］．*Acta Botanica Sinica*，44（10）：1135—1141

Jia WS，Zhang JH，Zhang DP，1996．Metabolism of xylem-delivered ABA in relation to ABA flux and concentration in leaves of maize and Commelina communis［J］．*Journal of Experimental Botany*，47：1085—1091

Koiwai H，Nakaminami K，Seo M *et al.*，2004．Tissue-specific localization of an abscisic acid biosynthetic enzyme，AAO3，in *Arabidopsis*［J］．*Plant Physiology*，134（4）：1697—1707

Krochko JE，Abrams GD，Loewen MK *et al.*，1998．(＋)-Abscisic acid 8′-hydroxylase is a cytochrome P450 monooxygenase［J］．*Plant Physiology*，118（3）：849—860

Leydecker MT，Moureaux T，Kraepiel Y *et al.*，1995．Molybdenum cofactor mutants，specifically impaired in xanthine dehydrogenase activity and abscisic acid biosynthesis，simultaneously overexpress nitrate reductase［J］．*Plant Physiology*，107（4）：1427—1431

Li Y，Walton DC，1987．Xanthophylls and abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean leaves［J］．*Plant Physiology*，85（4）：910—915

Mambelli S，Setter TL，1998．Inhibition of maize endosperm cell division

and endoreduplication by exogenously applied abscisic acid [J]. *Physiologia Plantarum*, 104: 266—277

Marin E, Nussaume L, Quesada A *et al.*, 1996. Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana plumbaginifolia*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of *Arabidopsis thaliana* [J]. *EMBO Journal*, 15 (10): 2331—2342

Melhorn V, Matsumi K, Koiwai H *et al.*, 2008. Transient expression of *AtNCED*3 and *AAO*3 genes in guard cells causes stomatal closure in *Vicia faba* [J]. *Journal of Plant Research*, 121 (1): 125—131

Parry AD, Babiano MJ, Horgan R, 1990. The role of cis-carotenoids in abscisic acid biosynthesis [J]. *Planta*, 182 (1): 118—128

Pfaffl MW, 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Research*, 29: 2002—2007

Pierce M, Raschke K, 1981. Synthesis and metabolism of abscisic acid in detached leaves of *Phaseolus vulgaris* L. after loss and recovery of turgor [J]. *Planta*, 153: 156—165

Qin X, Zeevaart JAD, 2002. Overexpression of a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene in *Nicotiana plumbaginifolia* increases abscisic acid and phaseic acid levels and enhances drought tolerance [J]. *Plant Physiology*, 128 (2): 544—551

Quarrie SA, Whitford PN, Appleford NEJ, 1988. A monoclonal antibody to (S) -abscisic acid: its characterization and use in a radio immunoassay for measuring abscisic acid in crude extracts of cereal and lupin leaves [J]. *Planta*, 173: 330—339

Razem FA, Luo M, Liu JH *et al.*, 2004. Purification and characterization of a barley aleurone abscisic acid - binding protein [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 9922—9929

Ren HB, Fan YJ, Gao ZH *et al.*, 2007a. Roles of a sustained activation of *NCED*3 and the synergistic regulation of ABA biosynthesis and catabolism in ABA signal production in *Arabidopsis* [J]. *Chinese Science Bulletin*, 52 (4): 484—491

Ren HB, Wei KF, Jia WS *et al.*, 2007b. Modulation of root signals in relation to stomatal sensitivity to root-sourced abscisic acid in drought-affected plants [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49: 1410—1420

Ren HB, Gao ZH, Chen L *et al.*, 2007c. Dynamic analysis of ABA accumulation in relation to the rate of ABA catabolism in maize tissues under water deficit [J]. *Journal of Experimental Botany*, 58 (2): 211—219

Saito S, Hirai N, Matsumoto C *et al.*, 2004. *Arabidopsis CYP*707*As* encode (+) -abscisic acid 8-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of abscisic acid [J]. *Plant Physiology*, 134 (4): 1439—1449

Saito S, Okamoto M, Shinoda S *et al.*, 2006. A plant growth retardant, uniconazole, is a potent inhibitor of ABA catabolism in *Arabidopsis* [J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 70 (7): 1731—1739

Schwartz SH, Qin X, Zeevaart JAD, 2003. Elucidation of the indirect pathway of abscisic acid biosynthesis by mutants, genes, and enzymes [J]. *Plant Physiology*, 131 (4): 1591—1601

Seo M, Koiwai H, Akaba S *et al.*, 2000a. . Abscisic aldehyde oxidase in leaves of *Arabidopsis thaliana* [J]. *The Plant Journal*, 23 (4): 481—488

Seo M, Peeters AJM, Koiwai H *et al.*, 2000b. The *Arabidopsis* aldehyde oxidase 3 (AAO3) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves [J]. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*, 97 (23): 12908—12913

Setter TL, Flannigan BA, Melkonian J, 2001. Loss of kernel set due to water deficit and shade in maize: carbohydrate supplies, abscisic acid, and cytokinins [J]. *Crop Science*, 41 (5): 1530—1540

Shen YY, Wang XF, Wu FQ *et al.*, 2006. The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor [J]. *Nature*, 443: 823—826

Umezawa T, Okamoto M, Kushiro T *et al.*, 2006. CYP707A3, a major ABA 8′-hydroxylase involved in dehydration and rehydration response in *Arabidopsis thaliana* [J]. *The Plant Journal*, 46 (2): 171—182

Wang ZL, Stefania Mambelli, Setter TL, 2002. Abscisic acid catabolism in maize kernels in response to water deficit at early endosperm development [J]. *Annals of Botany*, 90 (5): 623—630

Wei KF (**魏开发**), 2009a. Analysis of *AtNCED*3 and *AtAAO*3 promoters function and the promoter-driven tobacco (*Nicotiana tabacum*) *CHS* gene expression [J]. *Journal of Hubei University for Nationalities* (Natural Science Edition) (**湖北民族学院学报自然科学版**), 27 (2): 121—125

Wei KF (**魏开发**), Jia WS (**贾文锁**), Lin ZY (**林子英**) *et al.*, 2009b. Effect of *AtNCED*3 gene estradiol-induced expression on ABA biosynthetic genes and metabolic emzyme gene expression [J]. *Journal of Hubei University for Nationalities* (Natural Science Edition) (**湖北民族学院学报自然科学版**), 27 (1): 71—75

Weiler EW, Schnabl H, Hornberg C, 1982. Stress-related levels of abscisic acid in guard cell protoplast of *Viciafaba* L [J]. *Planta*, 154: 24—28

Xing Y, Jia WS, 2007. AtMEK1 mediates stress-induced gene expression of CAT1 catalase by triggering H_2O_2 production in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 58 (11): 2969—2981

Xing Y, Zhang SQ, Wang YG *et al.*, 2003. Protein tyrosine phosphatase is possibly involved in cellular signal transduction and the regulation of ABA accumulation in response to water deficit in Maize *L. coleoptile* [J]. *Chinese Science Bulletin*, 48 (5): 460—465

Xiong L, Zhu JK, 2003. Regulation of abscisic acid Biosynthesis [J]. *Plant Physiology*, 133 (1): 29—36

Yang JF, Lu SY, Cai JL *et al.*, 2008. Overexpressing *SgNCED*1 in tobacco increases ABA level, antioxidant enzyme activities, and stress tolerance [J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 27 (2): 151—158

Yang SH, Choi D, 2006. Characterization of genes encoding ABA 8′-hydroxylase in ethylene-induced stem growth of deepwater rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Biochemistry Biophysics and Reserach Communications*, 350: 685—690